

Irritabilidad oftálmica en adhesivos cianoacrílicos. Importancia de la evaluación histológica

María Elena Cañizares Graupera, Suanet Hernández Urquía, Nelson Merino García,* Gastón García Simon* y Ernesto Arteaga Hernández.**

Centro de Biomateriales, Universidad de la Habana, Avenida Universidad sin número, entre Calles Ronda y G, Código Postal 10400, El Vedado, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana. *Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana, Ciudad de La Habana. **Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 8 de marzo de 2004. Aceptado: 11 de febrero de 2005.

Palabras clave: histología, irritación oftálmica, adhesivos, cianoacrilatos, córnea.
Key words: histology, eye irritation, adhesives, cyanoacrylates, cornea.

RESUMEN. El estudio de adhesivos con base cianoacrílica con fines quirúrgicos para uso oftálmico requiere tanto de la evaluación clínica como histológica debido a que la recuperación del tejido puede inducir cicatrices perennes que solo son apreciables al microscopio. En el presente trabajo se aplicaron ambas metodologías a la evaluación de dos adhesivos con base cianoacrílica de producción nacional. El Tisuacryl®, diseñado para uso dérmico y el Gliciacryl, diseñado para uso en cirugía de la córnea, pues no existe ningún producto disponible en el mercado para uso ocular que sea totalmente tolerado. Se midieron los indicadores convencionales para el ensayo de irritación ocular para evaluar la conjuntiva (aparición de edema, eritema o secreción). Se incorporó la evaluación histológica con la cual, se evaluaron la hiperplasia epitelial, inflamación y fibrosis subcorneal para evaluar la córnea y el iris. Ambos indicadores se cuantificaron mediante el uso de escalas confeccionadas tipo Draize. Se encontró una respuesta adecuada para el Gliciacryl en la evaluación clínica, pero la inclusión de la histología demostró que ninguno de los dos adhesivos era apropiado para esta aplicación debido a que la fibrosis subcorneal fue progresiva para ambos. Su aplicación se ve limitada solo al caso que se sospeche la pérdida del órgano. A diferencia de la norma, se utilizaron los dos ojos de cada animal, lo que permitió ampliar la muestra con el empleo de un mínimo de animales de experimentación y de recursos materiales. El método desarrollado demostró ser sensible para evidenciar los objetivos planteados, ofreció mayor seguridad en la evaluación de los resultados y estimula a buscar nuevas formulaciones que salven la actual barrera. No obstante, se recomienda completar los estudios biológicos crónicos de estos adhesivos antes de continuar evaluando nuevas formulaciones.

ABSTRACT. Acrylic adhesives for surgical ophthalmic use need both, clinical and histological evaluations of ophthalmic irritation because tissue recovery could create marks that only could be seen under a microscope. In this work both methodologies were applied to the evaluation of two national cyanoacrylic adhesives. Tisuacryl®, for dermal use and Gliciacryl, a new material in order to be studied for corneal usage. Conventional parameters for eye irritation were measured (edema, erythema and secretion). Histological parameters as epithelial hyperplasia, inflammation and sub corneal fibrosis were also evaluated. Both parameters were quantified using Draize's type scales. Conventional parameters were normal for both adhesives but histology studies demonstrated that none of them were appropriated for this application, because sub corneal fibrosis was progressive for both adhesives. The developed method was enough to evaluate work objectives with a minimum of test animals and materials offering more safety in results evaluation. It is recommended complete biological chronic evaluation before the preparation of new similar formulations.

INTRODUCCION

Las guías internacionales para la evaluación de la irritación oftálmica de cosméticos y medicamentos exigen solo los indicadores clínicos del método de Draize,¹⁻⁵ sin embargo, se ha recomendado por otros autores la inclusión del estudio histológico para ganar en información.⁶ En el caso particular de los adhesivos quirúrgicos, los autores consideran que la incorporación de la histología es fundamental, debido a las consecuencias que puede traer para el paciente las huellas de la cicatrización. En dependencia de la zona tratada, puede limitar la visión.

Por otra parte, en una revisión sobre los adhesivos con base cianoacrílica que se aplican en cirugía ocular y específicamente, en la córnea, se pudo constatar que existen discrepancias en los resultados y que la tendencia general es reservar esos adhesivos para casos extremos en los cuales, se sospecha la pérdida de la visión,⁷ aunque no se ha encontrado ninguno que fuese específico para uso oftálmico.

Los adhesivos que existen en el mercado presentan limitaciones para este uso que pueden ser superadas, como es el caso de su elevada reactividad, la que provoca una fuerte reacción exotérmica o su irritabilidad debido a que son poco flexibles.⁸⁻¹⁰

Actualmente, se conoce que el modo de sellar las heridas de estos adhesivos se debe a una reacción química con el entorno biológico,¹¹ lo que ocasiona los daños mencio-

nados. Esto permite mejorar las nuevas formulaciones de un modo racional para darles usos más específicos, pero impone reevaluar los aspectos toxicológicos y carcinogénicos de estos adhesivos.

El objetivo de este trabajo fue establecer una metodología para realizar un estudio comparativo entre dos formulaciones farmacéuticas basadas en cianoacrilatos, el Gliciacryl, material en estudio con posible aplicación oftálmica para la zona de la córnea y el Tisuacryl[®], material preparado para uso cutáneo, sin perspectivas en esta aplicación, pero que sirve de referencia experimental.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron cinco conejos de 2 kg de peso corporal promedio, pertenecientes a la línea F1 procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, Ciudad de La Habana con su certificado de calidad.

Los animales se mantuvieron en condiciones de vivario 5 d previos al experimento.

Se evaluaron las estructuras oculares (córnea, iris y conjuntiva) macroscópicamente, 24 h antes del ensayo para evitar falsos positivos. Los animales se seleccionaron al azar y se colocaron en sus cepos, se les cortaron los pelos de los párpados, se anestesiaron con 200 μ L de colirio anestésico local de lidocaína 2 %. Pasado un tiempo prudencial, se comprobó su efecto acercando una varilla de vidrio al ojo y observando que el animal no pestañeaba. Se practicó un corte longitudinal de 1 cm en el ojo derecho de cada animal en la zona de la córnea con bisturí No. 11 de punta aguda. A continuación, los animales se separaron en tres grupos, dos para cada adhesivo y un animal como control que se dejó cicatrizar de forma espontánea. En cada caso, se selló la incisión dejando deslizar la punta roma de un aplicador de vidrio impregnado de adhesivo por la superficie de la herida (aproximadamente 20 μ L). Se dejó transcurrir 30 s para que los materiales sellaran. Al cabo de 1 h, se colocó una gota de fluoresceína sódica 1 %. Se evaluó mediante una escala de valores tipo Draize (Tabla 1) la posible aparición de edemas, eritema o secreción a intervalos de 1, 24, 48 y 72 h posteriores a la aplicación, según procedimiento internacional normalizado.¹ Nuevamente, se evaluó el sellado de las heridas mediante la instilación de una gota de una disolución de fluoresceína de sodio

2 % y se imprimió movimiento circular al párpado cerrado para homogeneizar la disolución. El ojo fue lavado con disolución salina de cloruro de sodio 0,9 %; se creó un ambiente de oscuridad y se hizo incidir luz con filtro violeta.

Los animales se mantuvieron en jaulas con libre acceso al agua y los alimentos a partir de una hora posterior al ensayo, con régimen de luz-oscuridad de 12 h X 12 h. Diariamente se observó el estado de ánimo, así como el comportamiento y se registró el peso antes de la segunda intervención. Transcurrido 5 d, se repitió todo el experimento utilizando los mismos animales para ampliar la muestra, incluyendo el control, pero esta vez, se realizó el procedimiento en el ojo izquierdo de cada animal.

A los 10 d, se dio por concluido el ensayo, lo que significó un período de 5 d para el ojo izquierdo y 10 para el derecho. Los animales fueron sacrificados por embolia gaseosa a través de una vena marginal de la oreja. Como disolución reguladora-fijadora para conservar las muestras anatómicas, se utilizó la de Davison, compuesta por 1 300 mL de alcohol absoluto, 300 mL de agua destilada, 200 mL de formaldehído y 100 mL de ácido acético glacial, los cuales se mezclan en ese orden y se completa a 2 L con agua destilada. Esta disolución es específica para conservar las estructuras oculares.¹²

Las estructuras anatómicas de cada ojo intervenido quirúrgicamente, se evaluaron de forma comparativa con el control mediante estudio histológico. Se efectuaron cortes entre 6 y 8 μ m en un micrótomos horizontal. Los cortes se realizaron perpendicularmente a la incisión para evitar que se perdiera la zona de aplicación del adhesivo. Para ello, se observaron las muestras en un microscopio estereoscópico MBC-9. Se incluyeron en parafina y se colorearon con hematoxilina-eosina. Después, se observaron en un microscopio binocular Olympus BH-2

a 100x y 400x. Los indicadores histológicos que se evaluaron por escala de Draize fueron: hiperplasia epitelial, inflamación y fibrosis subcorneal (Tabla 2).

RESULTADOS

Se observó que la fluoresceína se mantuvo adherida al adhesivo el tiempo que este permaneció en el sitio de implante, no obstante, se pudo comprobar mediante la fluorescencia ultravioleta que todas las heridas estaban perfectamente selladas. En la evaluación macroscópica para evaluar la conjuntiva, se pudo corroborar (Tabla 3), que los ojos tratados con el Tisuacryl[®] presentaron eritema promedio grado 2,60; edema promedio grado 1,30 y secreción promedio grado 2,35 al cabo de 1 h de su aplicación. La puntuación para el nuevo material Gliciacryl fue de 1,25 para los tres indicadores y para el control fue de cero. Según la evaluación, por la escala estos resultados, implican una irritación moderada para el Tisuacryl[®] y ligera para el nuevo producto. A las 24 h, la aparición de eritema y de secreción para los ojos tratados con el Tisuacryl[®] fue de 0,50 y no se detectó aparición de edema, mientras que los tres parámetros se evaluaron de cero para el nuevo material y el control. En la evaluación diaria se observó incremento normal del peso de los animales y un estado de ánimo normal y similar al del control. En la evaluación histológica para valorar los efectos sobre la córnea y el iris, se detectó aparición de hiperplasia epitelial en el caso de las estructuras anatómicas que se trataron con Tisuacryl[®], pero inflamación y fibrosis subcorneal para las estructuras tratadas con ambos materiales. Esta última se mantiene hasta los 10 d posteriores al tratamiento con ambos adhesivos y aumenta en el tiempo, mientras que los tres indicadores fueron cero para el control (Tabla 4).

DISCUSION

Los resultados demostraron la importancia de incorporar los estudios histológicos en la evaluación de la irritación oftálmica. Los resultados de la evaluación clínica sitúan al nuevo adhesivo en una posición ventajosa respecto al adhesivo cutáneo. En la evaluación histológica (Tabla 4), se detectó hiperplasia epitelial para el Tisuacryl[®] en ambos tiempos, lo que reveló la ocurrencia de actividad regenerativa en el tejido, así como la reversibilidad

Tabla 1. Escala tipo Draize para la evaluación macroscópica de eritema, edema y secreción.

Puntuación	Efecto
0	Ninguno
1	Ligero
2	Moderado
3	Bien definido
4	Severo

Tabla 2. Adaptación de la escala de Draize para la evaluación histológica de la hiperplasia epitelial.¹²

Puntuación	Efecto	Significado en hiperplasia
0	Ninguno	3 a 4 capas de keratocitos
1	Ligero	4 a 8 capas de keratocitos
2	Moderado	8 a 12
3	Bien definido	> 12

Tabla 3. Resultados de la irritación ocular macroscópica promedio al cabo de 1 y 24 h según la puntuación de la escala tipo Draize.

Producto	1					
	24					
	(h)					
	Indicador					
	Er	E	S	Er	E	S
Tisuacryl®	2,60	1,30	2,35	0,50	0	0,50
Gliciacryl	1,25	1,25	1,35	0	0	0
Control	0	0	0	0	0	0

Er Eritema. E Edema. S Secreción.

Tabla 4. Resultados del estudio histológico promedio de la irritación ocular según la tabla 2.

Producto	Tiempo (d)	Hiperplasia epitelial	Inflamación	Fibrosis subcorneal
Tisuacryl®	5	1,50	1,50	0,50
	10	1,50	0,50	1,00
Gliciacryl	5	0	1,00	0,50
	10	0	1,00	1,50
Control	5	0	0	0
	10	0	0	0

de este indicador. La puntuación según la escala, la situó en el intervalo de ligera, mientras que para el nuevo adhesivo y el control fue cero. Este resultado obra a favor del nuevo adhesivo y demuestra la obtención de una cicatrización tardía con el Tisuacryl® respecto al control y al nuevo material. La inflamación fue ligera y similar para ambos materiales, pero mantenida hasta los 10 d posteriores al tratamiento. La fibrosis subcorneal que es la huella debida a la cicatrización y que resulta de carácter permanente, se mantuvo hasta los 10 d y fue aumentando con el tiempo para ambos materiales, mientras que los tres indicadores resultaron cero en el control.

Contrariamente a los aparentes resultados alentadores en el análisis clínico, el material conlleva problemas, ya que la aparición de fibrosis provoca la pérdida de la visión en dependencia de la zona donde se aplique el producto. El modelo experimental ofrece resultados discriminatorios con un mínimo de

animales de experimentación y de recursos gastables y esclarece en cuanto a las consecuencias que deben esperarse al aplicar esos adhesivos.

Actualmente, se conoce que estos monómeros reaccionan químicamente en el sitio de aplicación transformándose en otro monómero,¹¹ aspecto que no se había estudiado con profundidad. Por las perspectivas de uso que presentan estos materiales, se coincidió con algunos autores,⁸ en la conveniencia de evaluar la biotransformación de la especie formada, así como de realizar estudios crónicos tales como: toxicidad, carcinogénesis, teratogénesis, toxicidad reproductiva y del desarrollo e inmunotoxicidad, aspectos decisivos para liberar el uso de tales adhesivos.

CONCLUSIONES

El modelo experimental utilizado en este trabajo, al incorporarle el análisis histológico, resulta suficientemente sensible para discriminar entre materiales candidatos a

adhesivos con un mínimo de animales, tiempo y recursos. El empleo de los dos ojos en cada animal, además de novedoso, permitió ampliar la muestra con el mismo número de animales de experimentación.

Aunque el nuevo material Gliciacryl supera en cualidades al adhesivo cutáneo Tisuacryl®, ninguno de los dos cumple con los requisitos necesarios para aplicarlos en la córnea debido a la aparición de fibrosis subcorneal.

Conocida la causa que origina la aparición de esta limitación, resulta conveniente concluir las evaluaciones biológicas crónicas de los cianoacrilatos para investigar nuevas formulaciones.

AGRADECIMIENTOS

Muy especiales, a la Dra. Olga Sonia León y al colectivo de trabajo de Farmacología del Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana.

BIBLIOGRAFIA

1. OECD. Acute Eye Irritation/Corrosion Guideline for testing of Chemicals, 405, 1987.
2. National Academy of Sciences, United States, Committee for the Revision of NAS, Publication 1138, 47-56.
3. Principles and Procedures for Evaluating the Toxicity of Household Substances, Academic of Science, Washington, USA, 481-490, 1977.
4. Draize J.H., Woodward G. and Calvery, H.O. Methods for the study of irritation and substance applied topically to the skin and mucous membrane. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **82**, 377, 1944.
5. Escobichon D. The Basis of Toxicology testing. McGill University, Montreal, Canada, 52, 1992.
6. Wallace H. Principles and methods of toxicology. Reven Press. Second Edition. N. York, 115, 1998.
7. Cañizares M.E. y Carral J.M. Empleo de adhesivos cianoacrilicos en cirugía ocular. **Rev. Cub. Med. Milit.**, **28**, 22, 1999.
8. Mulet M.E., Fouad H., Mahiques M., Alió J.L. y Martín, J.M. Adal - 1: Nuevo adhesivo sintético de uso en cirugía del estrabismo. **Arch. Esp. Oftalmol.**, **76**, 559, 2001.
9. Alvarado M.C., Mulet E. y Alió J.L. Bioadhesivos en cirugía ocular. **Arch. Esp. Oftalmol.**, **76**, 43, 2001.
10. Gómez J., Mulet M.E., Alió J.L., Mahiques M.M., Molina Y. y Martín J.M. Estudio comparativo entre diferentes adhesivos conjuntivales. **Arch. Esp. Oftalmol.**, **76**, 2459, 2000.
11. Cañizares M.E. Nuevo enfoque de la polimerización cianoacrilica en medios biológicos. Patente No. 03/2000, Oficina Cubana de la Propiedad Industrial.
12. Hernández-Urquía S. Evaluación preliminar de un adhesivo cianoacrilico para uso oftálmico. Universidad de la Habana, Cuba, 25, 1999.